

归芪益元膏对重离子辐射大鼠旁效应损伤的保护作用

张悦¹, 李金田^{1,2*}, 李娟³, 梁建庆^{2,3}, 张毅^{1,2}, 马天星¹

(1. 甘肃中医药大学中医临床学院, 甘肃兰州 730000; 2. 敦煌医学与转化教育部重点实验室, 甘肃兰州 730000; 3. 甘肃中医药大学基础医学院, 甘肃兰州 730000)

摘要: **目的** 探究归芪益元膏对重离子 ($^{12}\text{C}^{6+}$) 束辐射大鼠旁效应损伤的保护机制。**方法** 40只 Wistar 大鼠随机分为空白组、单纯辐射组、辐射加中药组、单纯中药组, 每组 10 只。灌胃给药 2 周后, 用 4 Gy $^{12}\text{C}^{6+}$ 束照射各组大鼠右肺, 7 d 后处死, HE 染色观察大鼠肺、肾组织病理变化, RT-qPCR、Western blot 法检测肺组织和肾组织 TGF- β 1、p-Smad2、Smad7 mRNA 和蛋白表达。**结果** 单纯辐射组大鼠双肺部分肺泡间隔断裂、肺泡腔不规则扩大; 左肾肾小球基底膜增厚, 肾小管上皮细胞水肿。辐射加中药组大鼠双肺部分肺泡腔缩小, 无纤维增生; 肾小管上皮轻微水肿, 未见增生与纤维化。单纯中药组大鼠双肺肺泡结构整齐, 未见增生; 肾小球基底膜与肾小球结构均正常。与空白组比较, 单纯辐射组大鼠双肺及左肾 TGF- β 1 mRNA 和蛋白, p-Smad2 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$), Smad7 mRNA 和蛋白表达降低 ($P < 0.05$); 与单纯辐射组比较, 辐射加中药组及单纯中药组双肺及左肾 TGF- β 1 mRNA 和蛋白, p-Smad2 蛋白表达均降低 ($P < 0.05$), Smad7 mRNA 和蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。**结论** 归芪益元膏通过抑制 TGF- β 1 与 p-Smad2 表达, 并升高 Smad7 表达, 有效防治重离子辐射及旁效应损伤。

关键词: 归芪益元膏; 重离子辐射; 旁效应损伤; TGF- β /Smads 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)06-1998-04

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.06.042

近年来, 癌症发病率逐渐升高, 严重威胁到人类的健康。放疗利用电离辐射可直接杀死肿瘤细胞, 是癌症的重要治疗措施之一。重离子 ($^{12}\text{C}^{6+}$) 束作为高传能线密度 (LET) 辐射可将高吸收剂量区 (Bragg 峰) 集中于病灶部位, 具有相对较高的生物学效应^[1]。然而 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐射在杀死恶性肿瘤的同时, 易伤及正常细胞或组织, 对人体造成更加严重的损伤, 即辐射旁效应 (radiation-induced bystander effects, RIBE)^[2]。然而旁效应的机制尚不明确, 已知的传导方式有①细胞间隙连接通讯; ②可溶性细胞因子; ③细胞介质^[3]。研究显示还有更多的物质参与了旁效应的发生^[4], 其中 TGF- β 1 被认为参与介导了 RIBE^[5]。

$^{12}\text{C}^{6+}$ 束旁效应引起的病证与中医火毒致病特征基本相同。放射射线“辐射毒”的猛烈性质及其对组织的损伤, 具有火热毒邪侵入血络, 传舍到脏腑, 损伤正气, 耗气伤阴, 或导致机体相关脏腑功能损伤, 津血俱耗, 造成机体阴阳平衡失调。李金田教授从人体脏腑整体观念出发, 结合治未病, 并以程钟龄《医学心悟》黄芪汤为基础方, 加甘肃道地药材当归, 组成归芪益元膏, 功能益气生血, 滋养肺肾, 培元固本。本研究以 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐射大鼠右肺, 探讨归芪益元膏对辐射大鼠肺肾旁效应的保护机制, 以期中药保护 RIBE 损伤提供科学依据。

1 材料

1.1 动物 SPF 级 Wistar 雄性大鼠 40 只, 体质量 (200±20) g, 由甘肃中医药大学科研实验中心提供, 实验动物生产许可证号 SCXK (甘) 2015-0002, 实验动物使用许可证号 SYXK (甘) 2015-0005。实验室湿度、温度均符合标准, 12 h/12 h 明暗交替, 自由进食饮水, 自由活动。

1.2 药物 归芪益元膏由黄芪 30 g, 当归、熟地黄、麦冬、人参、枸杞子各 15 g, 五味子 10 g 组成, 药材购自甘肃中医药大学附属医院, 经鉴定为正品。

1.3 试剂 TRIzol 试剂 (美国 Thermo Fisher 公司, 批号 101004); 荧光定量试剂盒、逆转录试剂盒 [元升生物科技 (上海) 有限公司, 批号 11201ES03、H3912240]; TGF- β 1、p-Smad2、Smad7 多克隆抗体 (英国 Abcam 公司, 批号 GR3237963-2、GR3186711-11、GR3260708-2); BCA 蛋白浓度测定试剂盒、4×蛋白上样缓冲液 (北京索莱宝科技有限公司, 批号 P1041); 高效 RIPA 裂解液、二抗辣根酶标记山羊抗兔 IgG、辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG (北京中杉金桥生物技术有限公司, 批号 ZB2301、ZB2305)。

1.4 仪器 蛋白核酸凝胶电泳转印系统、凝胶成像分析系统、荧光定量 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); -80 °C 冰箱 (青岛海尔特种制冷电器有限公司); 低温高速离心机 (美

收稿日期: 2021-12-09

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (81460695); 中国博士后科学基金 (2016M602887); 甘肃省中医药研究中心 2020 年专项开放课题 (zyzx-2020-zx17)

作者简介: 张悦 (1991—), 女, 博士生, 从事肺病方向的经方研究。Tel: 15214051346, E-mail: 455711775@qq.com

* 通信作者: 李金田 (1964—), 男, 硕士, 教授, 从事肺病方向的经方研究。Tel: 13609385352, E-mail: ljtd@gzsy.edu.cn

国 Kendro 公司); 酶标仪 [帝肯 (上海) 贸易有限公司]; 微量紫外分光光度计 (美国 Thermo Fisher 公司); 恒温箱 (上海一恒科学仪器有限公司)。

2 方法

2.1 药物制备 药材分别加 8、6 倍量水, 提取 2 次, 每次 2 h, 300 目滤布过滤, 合并滤液, 减压浓缩, 添加制剂辅料 (防腐剂、增稠剂等), 制成流浸膏, 流浸膏质量浓度为 1.64 g/mL。药物由甘肃中医药大学中药制药实验室制备。

2.2 分组及给药 大鼠按随机数字表法分为空白组、单纯辐射组、辐射加中药组、单纯中药组, 每组 10 只。给予 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐射前, 辐射加中药组和单纯中药组大鼠均灌胃给予 3.28 g/kg 归芪益元膏, 空白组和单纯辐射组均灌胃给予生理盐水, 每天 1 次, 连续 2 周。

2.3 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐射 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束辐射在中国科学院现代物理研究所兰州重离子研究中心的浅层肿瘤治疗终端进行。辐照方法为垂直浅辐照, 束流 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束。每组大鼠腹腔注射 10% 水合氯醛 (0.3 mL/100 g), 将麻醉后的大鼠置于辐射盘相应位置, 辐射源处用 5 mm 厚特制铅板屏蔽, 其中央钻有右肺等大等面积镂空孔。 $^{12}\text{C}^{6+}$ 束通过特制铅板垂直照射大鼠右肺区域, 确保其他组织器官未受辐射。本实验采取坪区辐照, 吸收剂量率 2 Gy/min, 时间 2 min, LET 20 keV/ μm , 能量 165 MeV, 照射总剂量 4 Gy。单纯辐射组和辐射加中药组大鼠进行照射, 空白组和单纯中药组大鼠不予照射。

2.4 取材及标本制作 辐射后第 7 天, 脱颈处死各组大鼠, 取出右肺、左肺、左肾, 分装于无酶冻存管中, 取一部分病变最明显的部位于 4% 多聚甲醛中固定, 剩余样品于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存。

2.5 HE 染色观察双肺、肾组织病理学变化 取 4% 多聚甲醛中固定的组织, 石蜡包埋切片, 行常规苏木精-伊红 HE 染色。在高倍镜下随机挑选 5 个视野, 观察双肺、肾组织变化。

2.6 Western blot 法检测双肺、肾组织中 TGF- β 1、p-Smad2、Smad7 蛋白表达 取 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存的组织, 提取双肺、左肾组织总蛋白, BCA 法测定蛋白浓度, 加蛋白上样缓冲液, 煮沸 5 min 进行变性。SDS-PAGE 凝胶电泳, 转膜, 封闭, 一抗 (1:500) $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜, 洗膜, 二抗 (1:5000) 室温孵育 3 h, 洗膜, 使用曝光液通过显影仪曝光, Image Lab 软件进行分析。

2.7 RT-qPCR 法检测肺肾组织中 TGF- β 1、Smad7 mRNA 表达 TRIzol 法提取大鼠双肺、左肾中总 RNA, 并按说明书合成 cDNA。以 GAPDH 为内参, 通过 PCR 仪进行扩增反应, 用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 法计算目的基因 mRNA 相对表达。引物由北京博迈德基因技术有限公司设计合成, 序列见表 1。

2.8 统计学分析 通过 SPSS 21.0 软件进行处理, 计量资料以 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 符合正态分布且方差齐, 多组间比较采用单因素方差, 方差不齐时则采用 Games-Howell 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

表 1 引物序列

基因	引物序列
TGF- β 1	正向 5'-ACTGGCTGAACCAAGGAGAC-3'
	反向 5'-CCTCGACCTTTGGGACTGAT-3'
Smad7	正向 5'-TTCATCAAGTCCGCCACACT-3'
	反向 5'-TGAAGTCTGGTTCATTGGGC-3'
GAPDH	正向 5'-AGTCCAGCCTCGTCTCATA-3'
	反向 5'-GAGAAGGCAGCCCTGTAAC-3'

3 结果

3.1 各组大鼠一般状态 空白组大鼠健康状况良好, 无异常体征; 单纯辐射组大鼠喜蜷卧, 活动量减少, 精神萎靡不振, 饮水、饮食量减少, 呼吸声粗, 反应迟钝; 与单纯辐射组比较, 辐射加中药组大鼠精神状态尚可, 活动度增加, 四肢有力, 反应灵敏, 二便正常, 且饮水、饮食量增加, 未见气喘呼吸不畅等症; 单纯中药组则与空白组大致相同, 二便正常, 精神状态佳, 皮毛光泽, 饮水略有增加。

3.2 归芪益元膏对大鼠双肺和肾组织病理形态学的影响

3.2.1 右肺 由图 1 可知, 空白组大鼠右肺肺泡结构无异常, 无瘀血及出血, 间质无增宽, 肺泡腔清晰; 单纯辐射组大鼠右肺部分肺泡间隔断裂, 肺泡腔不规则, 肺泡出现纤维增生现象, 结构排列紊乱, 大量炎性细胞浸润; 辐射加中药组大鼠右肺则有部分肺泡腔缩小, 无充血现象; 单纯中药组大鼠右肺未见纤维增生, 肺泡结构整齐, 肺泡间隔无断裂。

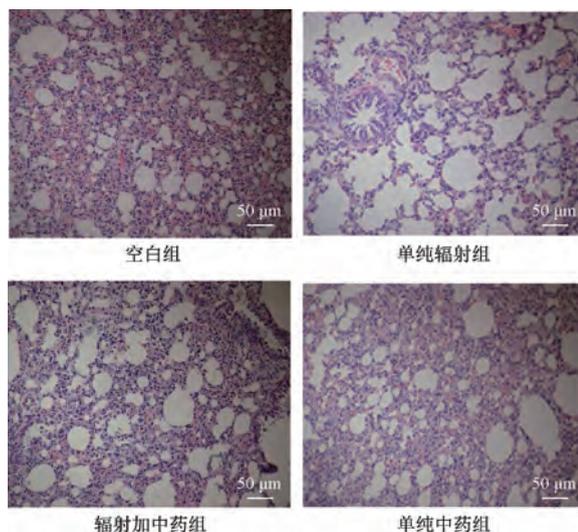


图 1 各组大鼠右肺组织病理变化 ($\times 200$)

3.2.2 左肺 由图 2 可知, 空白组大鼠左肺未出现明显病理改变, 管壁纤维未见增生, 肺组织结构清晰, 肺泡排列整齐; 单纯辐射组大鼠左肺可观察到肺泡腔不规则扩张, 肺泡间隔破裂和结构异常, 有纤维增生和炎性细胞浸润; 辐射加中药组大鼠左肺部分肺泡腔缩小, 无纤维增生, 无充血, 无肺泡间隔断裂; 单纯中药组大鼠左肺肺部结构与空白组无差异, 肺泡结构整齐, 未见纤维增生, 肺泡间隔无断裂。

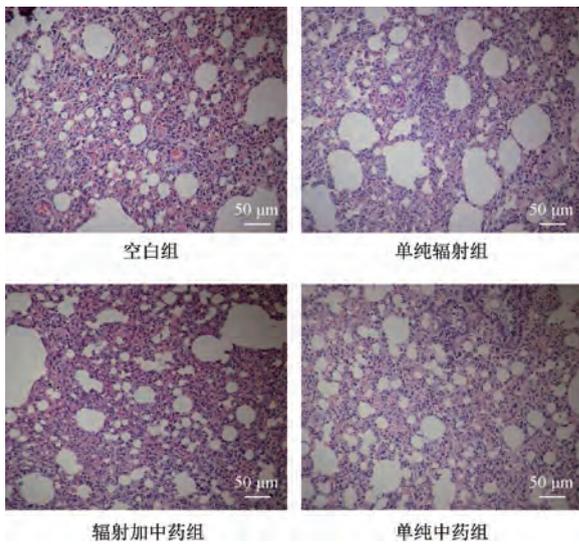


图2 各组大鼠左肺组织病理变化(×200)

3.2.3 左肾 由图3可知,空白组大鼠肾小管、肾小球结构正常,肾小管上皮无水肿,肾间质无炎性细胞浸润;单纯辐射组大鼠肾小球基底膜增厚,肾小管上皮组织细胞水肿,肾小管腔明显扩张,胞浆内有红色染色颗粒,肾小管上皮细胞质空泡有变性;辐射加中药组大鼠肾小管上皮出现轻微水肿,肾小球基底膜稍微增厚,未见增生及纤维化表现;单纯中药组大鼠肾小球结构正常,肾小球基底膜未

见增厚,肾小管上皮细胞未见细胞质空泡变性。

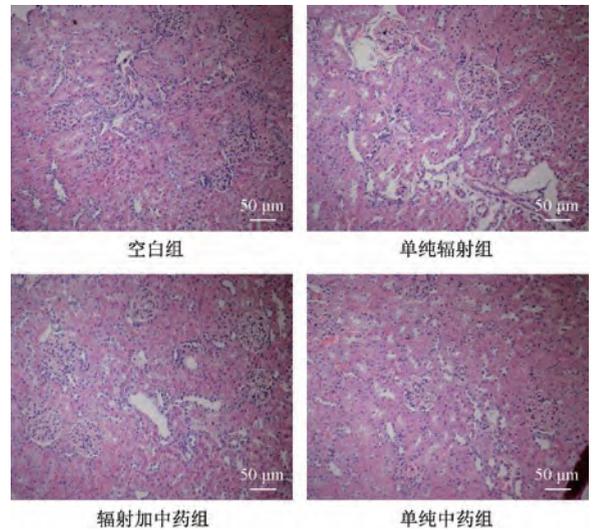


图3 各组大鼠左肾组织病理变化(×100)

3.3 归芪益元膏对大鼠双肺、左肾组织 $TGF-\beta 1$ 、 $Smad7$ mRNA 表达的影响 由表2可知,与空白组比较,单纯辐射组大鼠双肺及左肾组织 $TGF-\beta 1$ mRNA 表达升高 ($P < 0.05$), $Smad7$ mRNA 表达降低 ($P < 0.05$);与单纯辐射组比较,辐射加中药组和单纯中药组双肺及左肾组织 $TGF-\beta 1$ mRNA 表达降低 ($P < 0.05$), $Smad7$ mRNA 表达升高 ($P < 0.05$)。

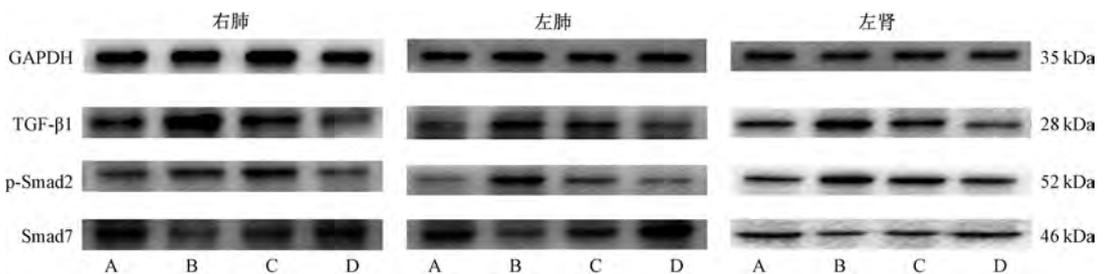
表2 各组大鼠双肺、左肾组织 $TGF-\beta 1$ 、 $Smad7$ mRNA 表达比较 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	$TGF-\beta 1$			$Smad7$		
	右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾
空白组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
单纯辐射组	1.90±0.21*	1.57±0.07*	1.49±0.11*	0.42±0.12*	0.42±0.10*	0.62±0.12*
辐射加中药组	1.32±0.23 [△]	1.35±0.16 [△]	1.20±0.08 [△]	0.80±0.15 [△]	0.73±0.11 [△]	0.80±0.10 [△]
单纯中药组	1.16±0.19 [△]	1.21±0.14 [△]	1.09±0.13 [△]	0.92±0.13 [△]	0.93±0.12 [△]	0.94±0.06 [△]

注:与空白组比较,* $P < 0.05$;与单纯辐射组比较,[△] $P < 0.05$ 。

3.4 归芪益元膏对大鼠双肺、左肾组织 $TGF-\beta 1$ 、p-Smad2、 $Smad7$ 蛋白表达的影响 由图4、表3可知,与空白组比较,单纯辐射组大鼠双肺及左肾组织 $TGF-\beta 1$ 、p-Smad2 蛋白表达升高 ($P < 0.05$), $Smad7$ 蛋白表达降低

($P < 0.05$);与单纯辐射组比较,辐射加中药组和单纯中药组大鼠双肺及左肾组织 $TGF-\beta 1$ 、p-Smad2 蛋白表达降低 ($P < 0.05$), $Smad7$ 蛋白表达升高 ($P < 0.05$)。



注:A~D为空白组、单纯辐射组、辐射加中药组、单纯中药组。

图4 各组大鼠双肺、左肾组织 $TGF-\beta 1$ 、p-Smad2、 $Smad7$ 蛋白条带图

4 讨论

$^{12}C^{6+}$ 束由于传能线密度高、相对生物学效应高、束流位置精准、低氧依赖性,被广泛应用于放射疗法^[6-8]。但临床用 $^{12}C^{6+}$ 束照射肿瘤,会造成病灶周围正常细胞组织辐射

损伤的发生,称之为RIBE。其损伤信号的“传递性”与中医“传舍性”理论十分相似^[9]。人体是一有机整体,五脏之间病变可相互传化,一脏有病可传之他脏。分析辨别大鼠右肺经 $^{12}C^{6+}$ 束辐照后的血象、症状、体征及胸腺、脾等

表3 各组大鼠双肺、左肾组织 TGF-β1、p-Smad2、Smad7 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	TGF-β1			p-Smad2			Smad7		
	右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾	右肺	左肺	左肾
空白组	0.74±0.09	0.96±0.15	0.52±0.06	0.45±0.08	0.83±0.08	0.77±0.08	0.77±0.09	2.04±0.06	2.39±0.05
单纯辐射组	1.59±0.19*	1.63±0.19*	1.23±0.12*	0.79±0.07*	1.57±0.19*	1.20±0.14*	0.50±0.08*	1.07±0.22*	1.48±0.13*
辐射加中药组	1.01±0.13 [△]	1.33±0.16 [△]	0.78±0.09 [△]	0.59±0.06 [△]	1.07±0.11 [△]	1.00±0.11 [△]	0.66±0.08 [△]	1.56±0.18 [△]	1.69±0.05 [△]
单纯中药组	0.67±0.09 [△]	1.03±0.11 [△]	0.50±0.05 [△]	0.46±0.08 [△]	0.80±0.11 [△]	0.68±0.08 [△]	0.80±0.08 [△]	1.76±0.13 [△]	2.41±0.11 [△]

注：与空白组比较，* $P < 0.05$ ；与单纯辐射组比较，[△] $P < 0.05$ 。

指标参数，均符合中医肺肾气阴两虚证^[10]。研究发现电离辐射后，成纤维细胞与肌成纤维细胞合成分泌大量胶原蛋白，最终导致肺纤维化的发生^[11]。其中 TGF-β1 是最关键的致纤维化细胞因子，辐射可诱发 TGF-β1 表达，释放大量的白细胞及成纤维细胞因子，导致炎症的发生^[12]。Shao 等^[5]发现，经辐照的细胞可释放 TGF-β1，并作用于未受照射的细胞，诱导旁效应的发生。尹晓明^[13]发现经 α 粒子射线照射后，加入 TGF-β1 受体酶抑制剂 HacaT 细胞中，其旁效应细胞微核形成率明显降低，并且 Smad2 磷酸化水平也明显降低，TGF-β1/Smad2 可能参与了 RIBE 损伤。林胜友等^[14]发现利用 RNA 干预技术沉默 TGF-β1 基因后，辐射组 p-Smad2、p-Smad3 均出现明显的差异表达。而陆金华等^[15]用麻杏石甘汤干预大鼠放射性肺炎模型，与单纯辐射比较，中药组 TGF-β1 表达在照射后 2、4、8 周明显降低，而 Smad7 表达升高。徐婷贞等^[16]发现，虎杖可以不仅可提高 Smad7 表达，还可抑制 p-Smad3 与 TGF-β1 表达，并调控 Smad4 通用性蛋白表达，最终阻止 TGF-β/Smad 信号在肺组织中的传导。辐射可诱导机体产生旁效应损伤，其心、肺、肾等均有涉及。卢志伟、刘凯等^[17-18]发现，无论给予大鼠全身 X 线或¹²C⁶⁺束流辐照，均会出现脾脏损伤。雷润宏^[19]发现，用 15 Gy ¹²C⁶⁺束照射大鼠脑局部后，在 1、2、3 月后，大鼠的全身多系统均出现病理损伤，如心、肝、脾肾等。

本研究通过 4 Gy ¹²C⁶⁺束辐照大鼠的右肺，并予以归芪益元膏干预，结果表明，¹²C⁶⁺束直接辐照大鼠右肺后，左肺、左肾出现了与右肺相似的生物学效应，而辐射加中药组辐射损伤则有明显的改善，其双肺及左肾 TGF-β1 mRNA 和蛋白，p-Smad2 蛋白表达均降低，Smad7 mRNA 和蛋白表达升高。

参考文献：

[1] Lara P C, López-Peñalver J J, Farias Vde A, et al. Direct and bystander radiation effects: A biophysical model and clinical perspectives[J]. *Cancer Lett*, 2015, 356(1): 5-16.
 [2] 张朝宁, 李金田, 刘永琦. 辐射旁效应及其机制研究进展[J]. *辐射防护通讯*, 2015, 35(3): 19-24.
 [3] Belchior A, Balásházy I, Monteiro Gil O, et al. Does the number of irradiated cells influence the spatial distribution of bystander effects[J]. *Dose Response*, 2014, 12(4): 525-539.
 [4] Le M, Fernandez-Palomo C, McNeill F E, et al. Exosomes are released by bystander cells exposed to radiation-induced biophoton signals: Reconciling the mechanisms mediating the

bystander effect[J]. *PLoS One*, 2017, 12(3): e0173685.
 [5] Shao C, Folkard M, Prise K M. Role of TGF-β1 and nitric oxide in the bystander response of irradiated glioma cells[J]. *Oncogene*, 2008, 27(4): 434-440.
 [6] Dziegielewski J, Goetz W, Baulch J E. Heavy ions, radioprotectors and genomic instability: implications for human space exploration[J]. *Radiat Environ Biophys*, 2010, 49(3): 303-316.
 [7] 安晓莉, 司庆宗, 刘 斌, 等. 重离子辐照对荷颊囊癌金黄地鼠血清 IL-2 水平的影响[J]. *南方医科大学学报*, 2012, 32(10): 1427-1430.
 [8] 刘家炉, 郭肖颖, 黎青青, 等. 碳离子辐射诱导秀丽隐杆线虫生殖细胞凋亡研究[J]. *原子核物理评论*, 2015, 32(1): 105-109.
 [9] 张朝宁, 李金田. 试论辐射旁效应损伤的中医病因: 辐射毒[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(2): 503-506.
 [10] 梁建庆, 李金田, 李 娟, 等. 病证结合大鼠辐射损伤模型构建初探[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(5): 2142-2145.
 [11] Ding N H, Li J J, Sun L Q. Molecular mechanisms and treatment of radiation-induced lung fibrosis [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(11): 1347-1356.
 [12] Khalil N, O' Connor R N, Flanders K C, et al. TGF-β1, but not TGF-β2 or TGF-β3, is differentially present in epithelial cells of advanced pulmonary fibrosis: an immunohistochemical study[J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 1996, 14(2): 131-138.
 [13] 尹晓明. 受照角质细胞 HaCat 产生电离辐射旁效应信号机制的研究[D]. 苏州: 苏州大学, 2015, 42-43.
 [14] 林胜友, 周罗瑜, 许 远. 加味麻杏石甘汤对放射性肺损伤 TGF-β/Smads 信号通路调控的研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2015, 39(12): 843-848; 853.
 [15] 陆金华, 林胜友, 代 琳, 等. 麻杏石甘汤对放射性肺炎 TGF-β1、SMAD7 调控的实验研究[J]. *浙江中医药大学学报*, 2012, 36(7): 795-797; 802.
 [16] 徐婷贞, 杨起初, 安娇娇, 等. 虎杖对放射性肺损伤大鼠 TGF-β1/Smad 蛋白的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(6): 1421-1425.
 [17] 卢志伟, 王 磊, 许小敏, 等. 当归及当归多糖对 X 射线照射致 SD 大鼠免疫功能损伤的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2017, 24(10): 44-48.
 [18] 刘 凯, 柴 辉, 孙少伯, 等. 当归红芪超滤膜提取物对¹²C⁶⁺重离子束辐照致 H22 荷瘤小鼠免疫功能损伤的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2017, 40(8): 661-668.
 [19] 雷润宏. 重离子辐射神经损伤的旁效应研究[D]. 北京: 北京理工大学, 2015.